



## Artículo

# DIFERENCIACIÓN GEOGRÁFICA EN CARACTERES DE LA MORFOLOGÍA CRANEANA EN EL ROEDOR SUBTERRÁNEO *Ctenomys australis* (RODENTIA: CTENOMYIDAE)

Matías S. Mora, Marcelo J. Kittlein, Aldo I. Vassallo  
y Fernando J. Mapelli

Laboratorio de Ecofisiología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Funes 3250, 3<sup>er</sup> piso, CC1245, 7600 Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Correspondencia: Matías S. Mora [[msmora@mdp.edu.ar](mailto:msmora@mdp.edu.ar)].

**RESUMEN.** En este trabajo se evalúa la existencia de diferenciación morfológica asociada a variación geográfica en el roedor subterráneo *Ctenomys australis*, el cual se distribuye en la primera franja de dunas costeras entre las localidades de Necochea y Punta Alta, provincia de Buenos Aires, Argentina. Utilizando Análisis de Función Discriminante (AFD), se evalúa si la variación geográfica es congruente con un modelo de aislamiento por distancia y se lo compara con el patrón de diferenciación reportado a partir de marcadores moleculares como el ADNmt (supuestamente neutral) y las aloenzimas. Se espera que la variación morfológica a nivel geográfico sea explicada, en gran medida, por los efectos de la deriva, contribuida por tasas de migración bajas y el propio aislamiento entre localidades. Esta predicción general de aislamiento por distancia no descarta la presencia de otras fuentes de variación morfológica, como aquella de origen adaptativo (adaptación local) y la inducida ambientalmente. En principio, se observó un patrón de aislamiento por distancia tanto en las distancias cuadradas de Mahalanobis y las alozímicas, que estuvieron correlacionadas con las distancias geográficas entre localidades. Además, se observó que gran parte de la variación fenotípica, como la variación relacionada a la morfología del cráneo o la variación aloenzimática, podría presentar una asociación con diferentes componentes de adaptación local y/o variación ambientalmente inducida, en forma paralela con la señal de expansión demográfica reciente detectada previamente en el ADNmt. Esto abre la posibilidad a que parte de la variación morfológica se encuentre sujeta a selección y guarde relación con procesos de adaptación local, manteniendo tasas evolutivas relativamente rápidas en comparación al genoma mitocondrial, que retiene una fuerte impronta de la historia demográfica.

**ABSTRACT.** Geographic differentiation in skull morphological characters in the subterranean rodent *Ctenomys australis* (Rodentia: Ctenomyidae). We assess geographical morphological differentiation in the subterranean rodent *Ctenomys australis*, which is distributed in the first line of coastal sand dunes between the localities of Necochea and Punta Alta, province of Buenos Aires, Argentina. Using a multivariate Discriminant Function Analysis (DFA), we evaluate geographic variation as congruent with an isolation by distance model and its correspondence with the pattern of differentiation reported for molecular markers like mitochondrial DNA (apparently neutral) and allozymes. Drift in conjunction with both low rates of migration and the isolation among localities are expected to be the main factor to explain an important fraction of the morphological variation at the geographic level. This general prediction of isolation by distance does not rule out the presence of adaptive or environmentally induced morphological variation. First, we observed isolation by distance in both the morphological Mahalanobis distances and the allozyme distances, which were correlated with the geographic

distances between localities. A large portion of the phenotypic variation, like variation in skull morphology or the alloenzymatic variation, could be also related with different components of local adaptation and/or environmental induced variation, in a parallel context to the recent signal of demographic expansion previously detected in the mitochondrial DNA. This situation suggests that a portion of morphological variation might be subjected to selection and has a relation with local adaptive processes, resulting in rapid rates of evolution in comparison to the mtDNA genome, which has a strong footprint of demographic history.

**Palabras clave:** ADNmt. Aislamiento por distancia. Aloenzimas. Buenos Aires. Diferenciación morfológica.

**Key words:** Allozymes. Buenos Aires. Isolation by distance. Morphological differentiation. mtDNA.

## INTRODUCCIÓN

El estudio de la variación morfológica en un contexto geográfico posibilita el desarrollo de hipótesis biogeográficas en poblaciones naturales de diferentes especies (Patton y Brylski, 1987), brindando una primera aproximación a los procesos de diferenciación subyacentes a la subdivisión poblacional y, en último término, a especiación. Estos niveles de variación se originan de efectos combinados de mutación y deriva genética, migración, selección local y eventos históricos relacionados a los cambios demográficos sufridos por las poblaciones (Greenberg et al., 1998; Babik et al., 2005; D'Anatro y Lessa, 2006; Fornel et al., 2010). Así, la diferenciación morfológica a nivel poblacional puede ser usada para evaluar la consistencia con procesos de adaptación local (hipótesis adaptativas) o, alternativamente, la presencia de variación ambientalmente inducida y/o diferenciación causada por procesos de deriva poblacional (hipótesis no adaptativas) (Smith y Patton, 1984; Patton y Brylski, 1987; Greenberg et al., 1998).

Según Smith y Patton (1984) y Slatkin (1987, 1993), las poblaciones de especies con dispersión limitada que han ocupado un rango de distribución amplia en hábitats continuos desarrollan un tipo de aislamiento por distancia en relación a su estructura geográfica, en contraposición a especies con altas capacidades dispersivas o bien especies en donde sus poblaciones han permanecido en aislamiento estricto y sin flujo génico durante bastante tiempo.

En genética poblacional, un patrón de aislamiento por distancia predice que, en ausencia de factores selectivos, existe una corresponden-

cia significativa entre las distancias geográficas y la variación genética (Wright, 1943, 1978). Bajo este modelo y tomando en cuenta loci neutrales, la similitud genética entre poblaciones disminuirá en tanto se incrementen las distancias geográficas (Crow y Kimura, 1970; Morton, 1973; Slatkin, 1993). Esto último dependerá directamente de la relación existente entre las distancias geográficas y las tasas de flujo génico, lo cual es determinado fundamentalmente por las características biológicas de las especies y la percepción de los niveles de fragmentación del hábitat actuales e históricos de los individuos que conforman una población (Wlasiuk et al., 2003; Mora et al., 2010).

Más allá del modelo teórico planteado por Wright (1943) para poblaciones ideales (flujo simétrico entre demos, tamaños efectivos equivalentes, poblaciones infinitas, etc.), es también esperable que un patrón de aislamiento por distancia se manifieste en otros modelos o circunstancias en los que exista una relación inversa de algún tipo entre las distancias geográficas e intercambio genético entre subpoblaciones (e.g., en un modelo de salto por piedras; Kimura, 1953; Kimura y Weiss, 1964). Desvíos significativos de este patrón pueden ser indicativos tanto de fuerzas selectivas operando diferencialmente a nivel poblacional, o bien de eventos demográficos históricos como determinantes principales de estructura poblacional contemporánea (Pogson et al., 2001; Turgeon y Bernatchez, 2001; Wlasiuk et al., 2003).

Tanto la genética cuantitativa como la genética de poblaciones clásica han intentado derivar modelos matemáticos para explicar la evolución de rasgos cuantitativos en poblaciones naturales

(Lande, 1991), brindando predicciones sobre los patrones esperados de variación geográfica bajo deriva genética y selección estabilizadora. La aplicación de modelos de diferenciación poblacional a partir de datos de rasgos poligénicos es bastante limitada en la actualidad, principalmente a causa de la dificultad de calcular con exactitud la varianza genética aditiva y los coeficientes de selección sobre dichos rasgos (véase Fornel et al., 2010). Particularmente, la varianza genética cuantitativa entre poblaciones ha mostrado tener gran aproximación a los  $F_{ST}$  clásicos bajo un modelo neutral y aditivo (Whitlock, 1999; Fornel et al., 2010).

A causa del aislamiento poblacional, alta dependencia al tipo de hábitat y patrones de dispersión restringidos, los roedores subterráneos conforman muy buenos modelos de estudio para poner a prueba hipótesis relacionadas a la diferenciación morfológica poblacional (Reig et al., 1990; Lessa, 1990, 2000; Freitas, 2005; D'Anatro y Lessa, 2006; Fornel et al., 2010).

Particularmente, el género *Ctenomys* (tuco-tucos) hace su aparición en el Plioceno, experimentando posteriormente una radiación de especies que ha sido calificada como explosiva por muchos autores. Si bien el número total de especies de *Ctenomys* es actualmente objeto de dudas (Parada et al., 2011), se considera que en la actualidad hay al menos 56 especies vivientes de tuco-tucos (Reig et al., 1990; Verzi et al., 1999; Vucetich et al., 1999; Castillo et al., 2005; Lessa et al., 2008). El cráneo, la dentición y el esqueleto postcraneal muestran una importante especialización a la vida subterránea y han sido caracterizados en diferentes trabajos (Ellerman, 1940; Lehmann, 1963; Dubost, 1968; Nevo, 1979; Nevo et al., 1990; Reig et al., 1990; Casinos et al., 1992; Vassallo, 1998; Lessa et al., 2008). Básicamente, los ctenómidos aflojan el suelo mediante varias combinaciones de cava-do, raspando el sustrato con las extremidades anteriores (braquio-excavación), por medio del empleo de los incisivos (dento-excavación) o bien por una combinación de ambos modos en distinto grado (Lessa, 1990; Lessa et al., 2008). Así, cambios estructurales específicos relacionados a la actividad subterránea estarían limitados por restricciones ejercidas por solapamientos

funcionales, como lo son la adquisición de alimento y la masticación. Factores mecánicos y estructurales restringirían, en cierta medida, la variación morfológica (Lessa y Patton, 1989; Lessa y Thaeler, 1989; Lessa y Stein, 1992; Vassallo, 2000; Lessa et al., 2008). Así, ciertas variables craneanas de gran importancia morfo-funcional presentarían mayores restricciones en cuanto a su variación morfológica si se las compara con estructuras óseas involucradas en menor medida en funciones trófico-excavatorias (Vassallo, 1998; Mora et al., 2003). De esta forma, caracteres relacionados a la excavación se encontrarían más influenciados por fuerzas selectivas al ser comparados con rasgos menos vinculables a funciones específicas (rasgos más neutrales desde el punto de vista morfológico). Asimismo, resulta interesante testear el modelo de aislamiento por distancia con caracteres poligénicos de la morfología craneana, involucrados en mayor o menor medida en funciones trófico-excavatorias.

*Ctenomys australis* presenta una distribución continua, restringida y casi lineal en la franja de dunas costeras del sureste de la provincia de Buenos Aires (Contreras y Reig, 1965; Mora, 2008; Mora et al., 2006, 2007, 2010). Su alta especialización trófica y de hábitat (Vassallo 1998; Mora et al., 2006, 2010) limita su distribución a la primera franja de médanos costeros (Contreras y Reig, 1965; Mora et al., 2006).

En este trabajo se analiza la variación poblacional en caracteres cráneo-dentarios de *C. australis*, relacionando dicho patrón de variación morfológica con la variación aloenzimática (datos reanalizados de Apfelbaum et al., 1991) y la variación en la Región Control del ADNmt (tomado de Mora et al., 2006). Si bien muchos trabajos que han realizado inferencias sobre procesos de divergencia a nivel poblacional toman en consideración sólo datos morfológicos, en la actualidad existe mayor consenso en que los análisis contemplen distintos niveles de variación, integrando información genético-molecular y morfológica (D'Elia et al., 1998; Greenberg et al., 1998; Hoelzel et al., 2000; D'Anatro y Lessa, 2006). Una de las preguntas que surge en este trabajo es si la variación a nivel morfológico es congruente con la va-

riación observada en las aloenzimas y con la observada en el ADN mitocondrial. Partimos de la hipótesis de que la variación genética y fenotípica (esta última estudiada a partir de la morfología craneana) observada en las poblaciones costeras de *C. australis* se ajustan al patrón de estructura genético-poblacional de aislamiento por distancia, el que predice una correlación positiva entre dichos niveles de variación y la distancia geográfica entre poblaciones. Esta hipótesis asume equilibrio entre deriva morfológica y migración, tal cual fue reportado a partir de los datos de Apfelbaum et al. (1991) con aloenzimas. No obstante, el escenario de deriva morfológica entre localidades no descarta la presencia de otras fuentes de variación, como lo son la selección local y/o variación fenotípica inducida por diferencias ambientales.

Por otro lado, se espera que aquellas variables con algún tipo de implicancia en funciones trófico-excavatorias (en contraposición con variables relativamente neutrales desde un punto de vista funcional) presenten distintos niveles de variación morfológica, independientemente de un componente de variación regional relacionado al aislamiento poblacional. Estos escenarios brindan la posibilidad de poner a prueba 1) el papel de la deriva y selección local sobre la diferenciación morfológica a nivel regional, y 2) cómo es el comportamiento de variables con distinta implicancia funcional en un marco de variación regional.

## MATERIALES Y MÉTODOS

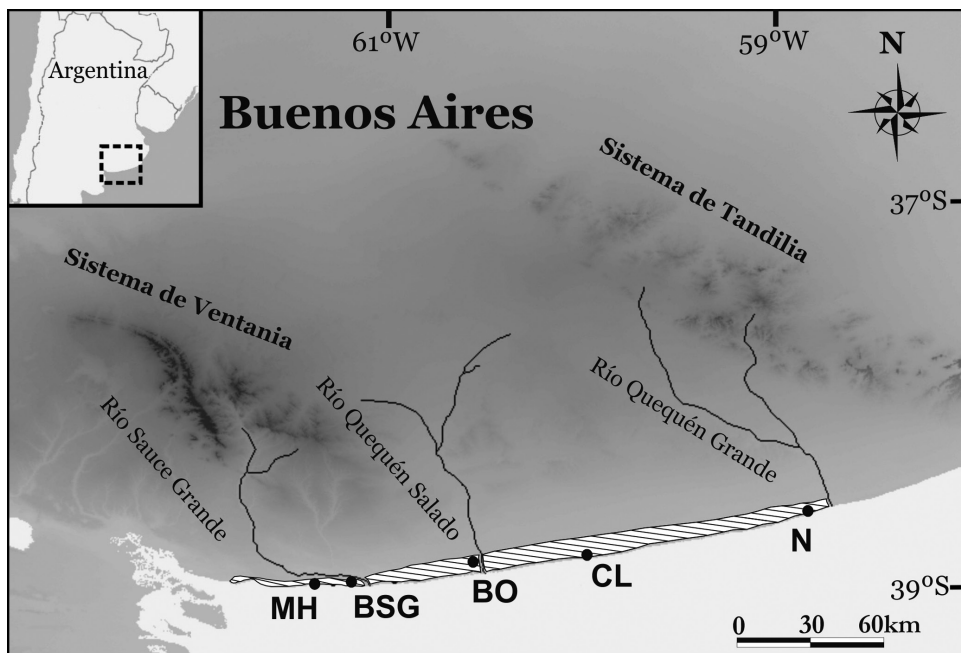
### Variación morfométrica a nivel geográfico a partir de Análisis de Función Discriminante (AFD)

La diferenciación morfológica a nivel geográfico se evaluó a partir de la aplicación de AFD (Bookstein et al., 1985; Stauss, 1985; dos Reis et al., 1990), tomándose en cuenta diferentes caracteres morfológicos cráneo-dentarios. Particularmente, el AFD es un procedimiento estadístico multivariado usado con frecuencia en estudios de diferenciación geográfica y en el análisis de la diferenciación de especies y macroevolución (Lessa y Patton, 1989; dos Reis et al., 1990). La aproximación del AFD permite la

comparación del grado de variabilidad existente entre poblaciones con relación al encontrado dentro de las poblaciones (Morrison, 1976; Chatfield y Collins, 1980). Por ello, la aplicación adecuada del AFD lleva implícita la corrección de la variación dentro de las muestras de cada grupo, controlando los efectos de dicha variación causados por diferencias en la ontogenia y/u otras causas naturales.

El análisis morfométrico fue realizado sobre muestras obtenidas en cinco localidades distribuidas a lo largo del rango de distribución total de la especie, de Este a Oeste: Necochea, Claromecó, Balneario Oriente (= Bln. Marisol), Balneario Sauce Grande y Monte Hermoso (**Fig. 1**). Se trabajó con material osteológico depositado en las colecciones del Museo Municipal de Ciencias Naturales y Tradicional "Lorenzo Scaglia" (MMP, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina) y en el Laboratorio de Ecofisiología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de Mar del Plata (véase **Apéndice**). El total de individuos por muestra y otros aspectos de las mismas se brindan en la **Tabla 1**.

El estudio de la diferenciación poblacional contempló la remoción estadística del efecto causado por diferencias en el tamaño de los cráneos dentro de cada localidad, permitiendo controlar posibles factores de variación como los producidos por diferencias en la ontogenia, y/o diferencias causadas por dimorfismo sexual. De esta forma, se empleó la metodología de dos Reis et al. (1990; véase también Strauss, 1985), donde los datos de las variables lineales logaritmizadas ( $\log_{10}$ ) fueron transformados a una matriz de datos residuales "sin el efecto del tamaño" y analizados posteriormente mediante AFD. El AFD libre del tamaño consiste básicamente en remover el efecto de la variación dentro de los grupos realizando una regresión de cada una de las variables estudiadas por el primer componente principal centrado por grupo (un estimador del tamaño multivariado), con la aplicación posterior del análisis canónico discriminante a los residuales obtenidos de las regresiones (Strauss, 1985). Así, los nuevos residuales expresan la variación resultante de la remoción del efecto del tamaño dentro de grupos. Esta aproximación permite centrarse sólo en la variación relacionada a los cambios



**Fig. 1.** Localidades incorporadas al análisis de variación morfométrica regional de *Ctenomys australis* en el sureste de la provincia de Buenos Aires, Argentina. El área rayada indica el rango de distribución total para la especie. Acrónimos y coordenadas geográficas de localidades en **Tabla 1**.

**Tabla 1**

Material cráneo-dentario de *Ctenomys australis* por localidad utilizado en el análisis de variación morfométrica.  $N_H$  = número de hembras,  $N_M$  = número de machos,  $N_T$  = número total,  $P_H$  = peso corporal promedio de las hembras (en gramos),  $P_M$  = peso corporal promedio de los machos (en gramos). Se indican las coordenadas geográficas de las localidades, todas pertenecientes a la provincia de Buenos Aires.

Localidades	$N_H$	$N_M$	$N_T$	$P_H$	$P_M$	Latitud	Longitud
Necochea [N]	9	5	14	293	312	38°37'	58°50'
Claromecó [CL]	13	6	19	300	418	38°51'	59°59'
Balneario Oriente [BO]	13	0	13	317	-	38°54'	60°31'
Balneario Sauce Grande [BS]	8	4	12	307	390	38°58'	60°59'
Monte Hermoso [MH]	11	3	14	266	387	38°59'	61°18'

en la forma multivariada, maximizando las diferencias morfológicas entre poblaciones y evaluando aquellas variables con mayor contribución a la discriminación poblacional.

En función de descartar la posible interacción entre diferentes factores se realizó un análisis multivariado de la varianza de dos vías (MANOVA). Los resultados del MANO-

VA mostraron la falta de interacción entre el “sexo” y la “localización geográfica” como factores, permitiendo de este modo considerar ambos sexos en el mismo análisis multivariado (datos de sexo vs. datos de localidad:  $F = 1.28$ ,  $P = 0.1135$ ) sin tener en cuenta el dimorfismo sexual existente en el tamaño corporal (Zenuto y Busch, 1998).



A partir de la aplicación de una serie de AFD iniciales independientes del tamaño (AFD<sub>IT</sub>) que contemplaron 36 variables originales (medidas con calibre digital con precisión de 0.01 mm sobre diferentes regiones del cráneo; Fig. 2; véase también Mora et al., 2003), se obtuvieron las 18 variables más explicativas en relación a la discriminación entre grupos de localidades. Estas 18 variables fueron utilizadas en los AFD<sub>IT</sub> posteriores. Como criterio de clasificación para la obtención de los modelos discriminantes con mayor poder explicativo (o variables más explicativas) se compararon los valores de  $\lambda$  de Wilks, su valor de F y probabilidad global asociado. Además, se evaluó el porcentaje de casos correctamente clasificados a sus respectivas poblaciones de origen (matriz de clasificación) y los valores de significancia asociados de cada una de las variables incluidas en cada modelo de Función Discriminante.

De esta forma, los AFD iniciales libres del efecto del tamaño (AFD<sub>IT</sub>) tomaron en cuenta las siguientes 36 variables cráneo-dentarias: longitud de la serie dentaria (SD), longitud del proceso supra-orbital (PO), ancho del foramen incisivo (AFI), ancho entre procesos pterigoideos (PL), longitud del primer, segundo y tercer molar superior (LM<sup>1</sup>, LM<sup>2</sup>, LM<sup>3</sup>, respectivamente), ancho del tercer molar superior (AM<sup>3</sup>), longitud de la caja craneana (LCC), longitud del basicráneo (B), longitud basioccipital-paladar (LBP), longitud de la diastema (D), longitud de la base (BA), an-

cho rostral (AR), longitud rostral (LR), ancho zigomático (AC), longitud zigomático (LC), ancho de la bula timpánica (ABT), longitud de la bula timpánica (LBT), longitud basilar (LB), ancho incisivos superiores (AI), grosor incisivos superiores (GI), altura incisivos superiores (AIS), longitud del arco de los incisivos superiores (DIS), altura del cráneo (ACr), longitud cavidad glenoidea (LCG), longitud de la serie dentaria alveolar (SDA), longitud nasal (LN), ancho mandibular (AM), brazo de palanca externo de la musculatura masetérica (Be), brazo de palanca interno de la musculatura masetérica (Bi), altura del arco de los incisivos (AAI), ancho entre cóndilos mandibulares (ACM), longitud del proceso coronóide al extremo de los incisivos inferiores (LCEI), ancho entre procesos coronoides (APC), longitud del cráneo (LCr) (Fig. 2; véase Mora et

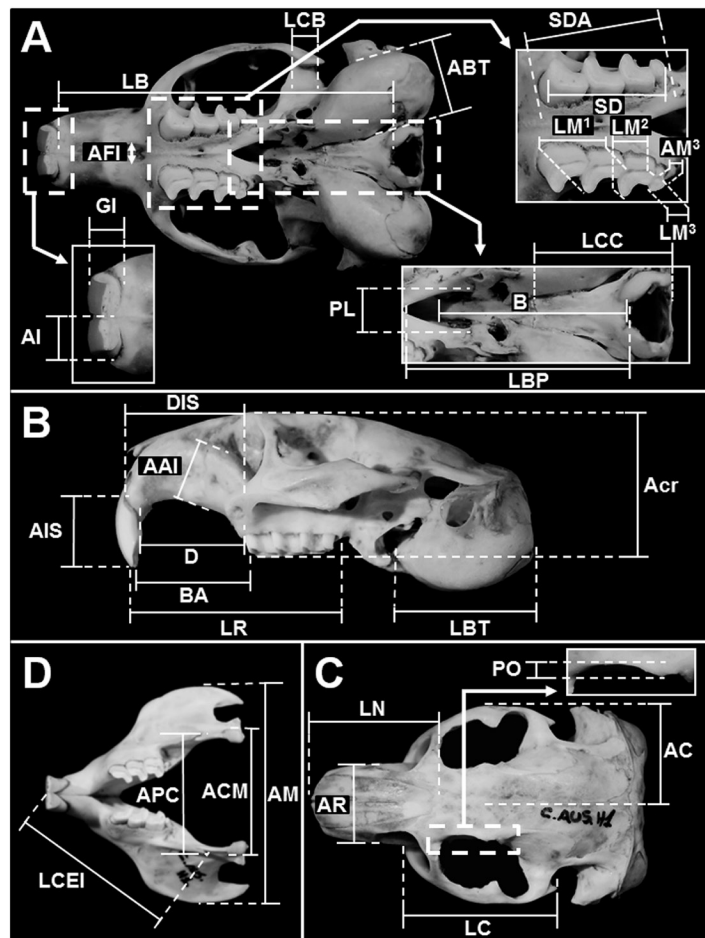


Fig. 2. Cráneo en norma ventral (A), lateral izquierda (B) y dorsal (C) y mandíbula en norma oclusal (D) de *Tenomys australis* indicando las variables consideradas en los AFD<sub>IT</sub> y AFD<sub>PA</sub>. Para la referencia de los acrónimos, véase Materiales y Métodos.

al., 2003; Vassallo y Mora, 2007). Las variables  $Be$  y  $Bi$  son mostradas en Mora et al. (2003) y son interpretadas en función de las fuerzas externa e interna de la musculatura masetérica, siguiendo a Lessa (1990). Ya que la musculatura masetérica presenta su origen e inserción a lo largo de la arcada zigomática (la cual contiene a la fosa glenoidea en su extremo posterior) y siendo que la inclinación postero-anterior de los maseteros en *Ctenomys* es de aproximadamente  $70^\circ$  con respecto al plano oclusal de la serie dentaria, el  $Bi$  fue estimado como  $= (\text{seno } 70^\circ \times LC)/2$  (Vassallo, 1998, 2000; véase también Maynard-Smith y Savage, 1959). La búsqueda exploratoria a partir de las 36 variables lineales sirvió para seleccionar un modelo discriminante independiente del tamaño ( $AFD_{IT}$ ) de gran poder explicativo en la diferenciación entre localidades.

Además, se aplicó un AFD teniendo en cuenta 6 variables angulares ( $AFD_{VA}$ ) tomadas sobre un conjunto de piezas dentarias del maxilar (incisivos, premolares y molares superiores). Dichas variables fueron escogidas de acuerdo

a un exhaustivo análisis sobre la variación en la inclinación de los lóbulos anterolabial y posterolingual de los molariformes. Debido a la falta de diferencias en cambios alométricos en cuanto a las proporciones dentarias entre individuos juveniles y adultos y entre sexos (Mora y Vassallo, 2003; Vassallo y Mora, 2007), la corrección en las diferencias en el tamaño de los cráneos no fue tomada en cuenta para el  $AFD_{VA}$ . Las mediciones de los ángulos fueron realizadas sobre fotografías tomadas con una cámara digital Nikon Coolpix 3.1 Mg., y a partir de dibujos efectuados con cámara clara adosada a una lupa Nikon SMZ645. Estas fueron: ángulo de la concavidad labial que forman el lóbulo anterior y posterior del premolar superior (pm4-in); ídem para primer molar superior (m1-in); ídem para el segundo molar superior (m2-in); ángulo que forma el lóbulo anterior y posterior del premolar superior sobre cara lingual (pm4-ex), ídem para el primer molar superior (m1-ex), ídem para el segundo molar superior (m2-ex) (Fig. 3).

A partir del  $AFD_{IT}$  y del  $AFD_{VA}$  se calcularon las matrices de distancias cuadradas de Mahalanobis, con su correspondiente probabilidad asociada. El aporte relativo de cada una de las variables a cada una de las funciones discriminantes fue calculado a partir de los coeficientes de correlación (vectores de correlación), producto de la correlación entre los coeficientes individuales de las variables canónicas y el valor de las variables originales (dos Reis et al., 1990). El autovalor correspondiente a cada autovector fue indicativo del peso relativo de cada función discriminante a la diferenciación entre localidades.

Una vez obtenidas las variables más explicativas del  $AFD_{IT}$ , se realizó un

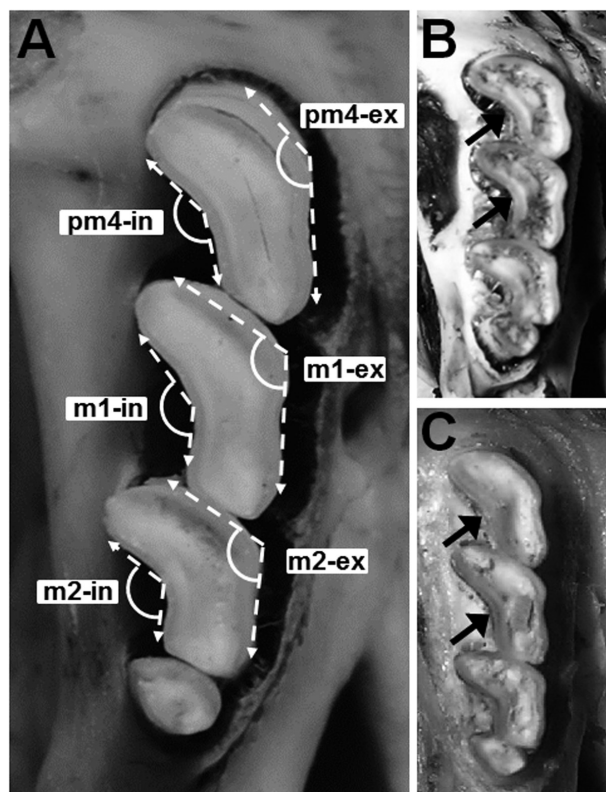


Fig. 3. Variables angulares tomadas sobre el plano oclusal de la serie dentaria del maxilar derecho de *Ctenomys australis* (A); se muestra, además, el grado de variación en las variables angulares pm4-in y m1-in (flechas negras) para un ejemplar de la localidad de Necochea (B) y otro de Monte Hermoso (C). Para la referencia de los acrónimos, véase Materiales y Métodos.

AFD por pasos hacia atrás ( $AFD_{PA}$ ). Este procedimiento permitió determinar aquellas variables que contribuyeron en mayor medida (altamente significativas) a la discriminación entre grupos. La misma aproximación del AFD por pasos hacia atrás se aplicó al conjunto de variables angulares ( $AFD_{VAF}$ ). El AFD por pasos hacia atrás incluye inicialmente todas las variables en el modelo, eliminando por pasos aquellas que menos contribuyen a la predicción sobre la conformación de los grupos. De esta forma se obtiene un modelo reducido de las variables con mayor aporte a la discriminación. Todos los Análisis de Función Discriminante fueron realizados con el programa STATISTICA TM v7.0 (Statsoft, Inc.).

### **Correlación entre la variación morfológica y molecular en un contexto geográfico**

Se evaluó si la variación en la morfología del cráneo se ajusta a un patrón de aislamiento por distancia, sin descartar que parte de dicha variación se encuentre relacionada a efectos ambientalmente inducidos, o bien contenga un componente de adaptación local. Para esto, se correlacionaron las distancias geográficas entre localidades y las distancias morfométricas (distancias cuadradas de Mahalanobis) calculadas a partir del AFD libre del efecto del tamaño del cráneo ( $AFD_{IT}$ ), y las calculadas a partir del  $AFD_{VA}$ . La significancia de las correlaciones fue calculada a partir de un test de Mantel (Mantel, 1967), en donde 10 000 iteraciones de bootstrap sirvieron para generar la distribución nula de la variable.

Además, se correlacionaron las distancias morfométricas estimadas a partir de las distancias cuadradas de Mahalanobis del  $AFD_{IT}$  y del  $AFD_{VA}$ , con las distancias moleculares estimadas tanto a partir de aloenzimas (recalculadas a partir de los datos de Apfelbaum et al., 1991, usando las distancias genéticas de Nei; véase Nei, 1972) como a partir del ADN mitocondrial (datos extraídos de Mora et al., 2006). Estas últimas distancias fueron calculadas a partir de la ecuación  $Ne_m = (1 - \Phi_{ST}) / (2\Phi_{ST})$  que expresa el flujo génico entre poblaciones, donde  $Ne_m$  corresponde al tamaño efectivo poblacional de las hembras multiplicado por la tasa de migración, y el  $\Phi_{ST}$  corresponde al índice de

fijación estimado a partir del método de Weir y Cockerham (1984). También se analizó la relación existente entre la variación en los marcadores moleculares (ADNmt y aloenzimas) y las distancias geográficas entre localidades. Las correlaciones fueron puestas a prueba a partir de tests de Mantel, con 10 000 iteraciones de bootstrap que sirvieron para contrastar el valor del estadístico  $r$  con la distribución nula de la variable.

## **RESULTADOS**

### **AFD independiente del tamaño a partir de variables lineales**

El total de variables incluidas en los análisis pasaron las pruebas de normalidad (tests de Shapiro-Wilk) y homocedasticidad (test de Levene), cumpliéndose con los supuestos del AFD. Tomando en cuenta las primeras 4 funciones discriminantes, el  $AFD_{IT}$  logró discriminar las 5 localidades incluidas en el análisis. La **Tabla 2** muestra las probabilidades de que un caso provenga de un grupo particular, lo que resulta proporcional a las distancias cuadradas de Mahalanobis desde el centroide de ese grupo (dicha distancia no es exactamente proporcional, ya que asumimos distribución normal multivariada alrededor de cada centroide; **Tabla 3**). La matriz de clasificación muestra un 100% de los casos correctamente clasificados para las localidades de Necochea, Balneario Oriente y Claromecó. En concordancia, las localidades de Monte Hermoso y Balneario Sauce Grande también presentaron valores altos en cuanto al porcentaje de clasificación (85.71 y 91.67%, respectivamente; **Tabla 2**), observándose sólo 3 casos incorrectamente clasificados con respecto a su localidad de origen: 2 ejemplares de Monte Hermoso clasificados a Claromecó y Balneario Sauce Grande y 1 ejemplar de Balneario Sauce Grande clasificado a Monte Hermoso. En resumen, la probabilidad de clasificación de casos a las localidades de origen sugiere gran diferenciación poblacional para las 5 localidades analizadas.

A continuación se detallan las variables del modelo discriminante que resultaron ser significativas ( $P < 0.05$ ) en la clasificación de casos en relación a sus poblaciones de origen



**Tabla 2**

Clasificación de casos a las localidades de origen. Se muestra la matriz de clasificación con el porcentaje de casos correctamente clasificados a sus respectivas localidades de origen. Además se muestra el porcentaje de asignación de individuos a las respectivas localidades. Acrónimos de localidades en **Tabla 1**.

Localidades	% de Clasificación	CL	MH	N	BO	BSG
CL	100	19	0	0	0	0
MH	85.71	1 (7.14%)	12 (85.71%)	0	0	1 (7.14%)
N	100	0	0	14	0	0
BO	100	0	0	0	13	0
BSG	91.67	0	1 (8.33%)	0	0	11 (91.67%)
Total	95.48	20	13	14	13	12

**Tabla 3**

Diferenciación entre localidades. Matriz de distancias cuadradas de Mahalanobis para el  $AFD_{IT}$  (por arriba de la diagonal) y sus correspondientes valores de probabilidad asociada (por debajo de la diagonal) para las 5 localidades analizadas. Los asteriscos indican diferencias estadísticas significativas (\*  $P < 0.05$ ) y altamente significativas (\*\*  $P < 0.001$ ) entre localidades. Acrónimos de localidades en **Tabla 1**.

Localidades	CL	MH	N	BO	BSG
CL	-	14.60	34.59	26.52	16.60
MH	**	-	38.92	19.58	10.67
N	**	**	-	35.36	48.10
BO	**	**	**	-	17.26
BSG	**	*	**	**	-

[(12 de 18 variables totales;  $\lambda$  de Wilks = 0.008,  $F(72.2) = 6.659$ ,  $P < 0.001$ )]: PO, AFI, LM<sup>3</sup>, B, BA, LC, ABT, GI, Acr, LCG, LN y AM (**Fig. 2**). Las distancias cuadradas de Mahalanobis (**Tabla 3**) muestran que Necochea y Balneario Sauce Grande corresponden al par de localidades con mayor diferenciación, seguido del par Necochea-Monte Hermoso y del par Necochea-Balneario Oriente. Por otro lado, las distancias multivariadas de Mahalanobis mostraron diferenciación significativa entre Monte Hermoso y Balneario Sauce Grande, localidades que sólo se encuentran distanciadas a 15 km ( $F = 2.86$ ,  $P < 0.05$ ; **Tabla 3**). Por otro lado, el conjunto de localidades Monte Hermoso y Balneario Sauce Grande presentaron mayor diferenciación con

Balneario Oriente (localidad geográficamente más cercana) que con Claromecó (localidad más distanciada). De acuerdo a las distancias de Mahalanobis, la localidad de Necochea resultó ser la población más diferenciada en relación al resto de las poblaciones analizadas (**Tabla 3**).

Las 4 funciones canónicas discriminantes resultaron ser altamente significativas ( $P < 0.001$ ). En la **Tabla 4** se muestra la contribución relativa de cada una de las variables a las 4 funciones canónicas discriminantes (coeficientes de los vectores de correlación). La primera función canónica discriminante explicó el 52% de la discriminación total entre las poblaciones, siendo las variables que más aportaron PO, AFI, LM<sup>3</sup>, BA, LC, AI, ACr, LCG y AM. Las

**Tabla 4**

Contribución de las variables en la discriminación poblacional. Se muestra la matriz de estructura con el peso relativo de cada una de las 18 variables (coeficientes estandarizados de las variables canónicas) en relación a las 4 funciones canónicas discriminantes. El autovalor (VA) y su correspondiente porcentaje de explicación indican el peso relativo de cada función discriminante a la diferenciación entre localidades. Acrónimos de las variables en Materiales y Métodos.

Variables Lineales	Funciones Canónicas Discriminantes			
	1 <sup>ra</sup>	2 <sup>da</sup>	3 <sup>ra</sup>	4 <sup>ta</sup>
SD	-0.012	0.195	0.448	0.180
PO	-2.305	0.137	-0.820	2.392
AFI	-0.596	0.026	-0.751	-0.268
PL	0.071	0.321	0.048	-0.489
LM <sup>1</sup>	-0.177	0.193	0.296	0.103
LM <sup>3</sup>	-1.989	-0.047	-1.458	1.457
B	-0.195	0.009	0.376	0.906
BA	-1.089	0.448	-0.353	-0.901
LC	-1.117	-0.297	-0.617	-0.279
ABT	0.026	-0.711	-0.485	-0.564
AI	-0.805	0.449	0.289	0.039
GI	-0.250	-0.579	-0.088	0.859
AIS	-0.271	0.653	-0.424	-0.112
ACr	0.681	-1.140	0.003	-0.039
LCG	-0.862	0.070	0.217	0.220
LN	0.085	1.001	-0.067	0.401
AM	1.056	0.650	0.560	0.400
BE	0.210	-0.120	-0.930	1.710
VA	4.730	3.100	1.430	0.860
% de explicación	52	28	13	7

variables PO, AI, AM y la morfología del tercer molar de la serie dentaria superior (LM<sup>3</sup> y AM<sup>3</sup>) resultaron ser los principales descriptores métricos para diferenciar a las poblaciones en estudio, en especial las poblaciones de los extremos del rango de distribución (Necochea vs. el conjunto formado por Monte Hermoso y Balneario Sauce Grande).

La segunda función canónica discriminante explicó el 28% de la diferenciación

interpoblacional, siendo las variables de mayor peso BA, ABT, GI, AI, AIS, ACr, LN y AM (**Tabla 4**).

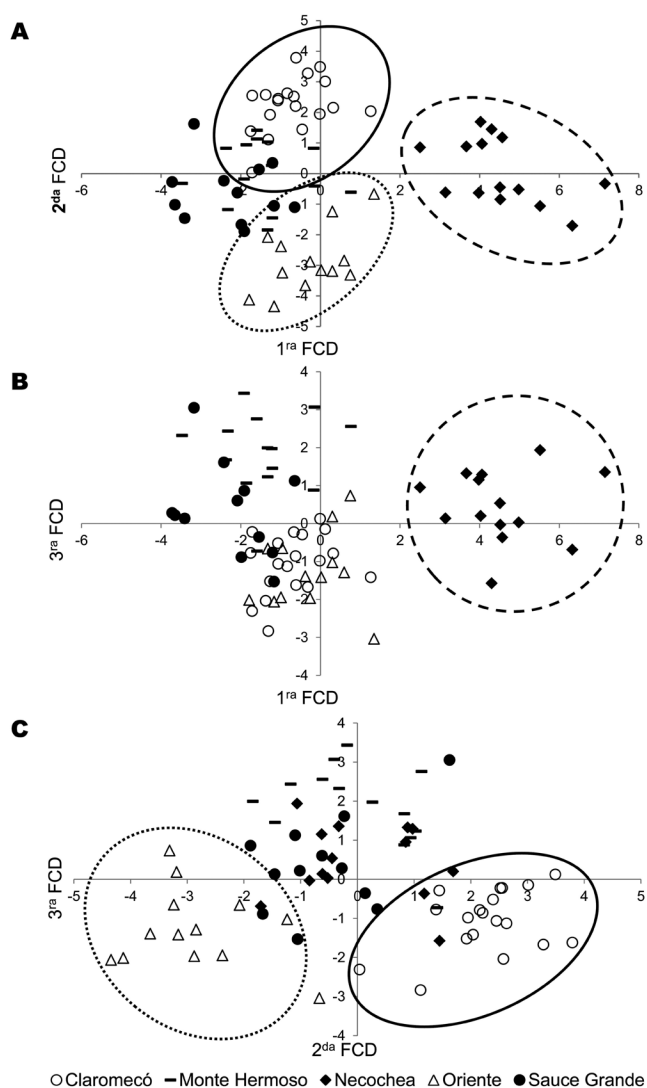
La tercera función discriminante explicó el 13% de la diferenciación total, siendo SD, PO, AFI, LM<sup>3</sup>, LC, ABT, AM y BE las variables que más contribuyen a la diferenciación dentro de esta función. Por último, la cuarta función discriminante, si bien es significativa, sólo explica el 7% de la diferenciación entre poblaciones,

siendo PO, LM<sup>3</sup>, B, BA y BE las variables de mayor peso (Tabla 4).

La Fig. 4 muestra el resultado de la diferenciación poblacional a partir de la gráfica de las primeras tres funciones canónicas discriminantes. La primera función canónica discriminante explicó en gran medida la fuerte diferenciación entre Necochea y el resto de las poblaciones (Tabla 5, Figs. 4A y 4B), en especial en relación a Monte Hermoso y Balneario Sauce Grande. Además, esta función muestra la separación de las localidades de Balneario Oriente y Claromecó y el solapamiento existente entre Monte Hermoso y Balneario Sauce Grande, indicando cierta similitud morfológica entre estas dos últimas localidades. La segunda función canónica separa fuertemente a las localidades de Balneario Oriente y Claromecó (Figs. 4A y 4C), mientras que el tercer eje canónico discrimina, en forma moderada, el grupo formado por Balneario Oriente y Claromecó del grupo Monte Hermoso y Balneario Sauce Grande (Figs. 4B y 4C).

El AFD “por pasos hacia atrás” (AFD<sub>PA</sub>), realizado a partir de las variables más explicativas del AFD<sub>IT</sub> (18 variables de entrada), permitió definir a las variables AM, LCG, ABT, BA, ACr y LN como las más importantes en la diferenciación interpoblacional [( $\lambda$  de Wilks=0.067, F (24.21)=10.66, P < 0.001)]. El

AFD<sub>PA</sub> no mostró diferenciación significativa entre Monte Hermoso y Balneario Sauce Grande (F=1.56, P=0.17) a partir de estas últimas 6 variables altamente explicativas, coincidiendo, al igual que el AFD<sub>IT</sub> estándar, en que ambas localidades serían las de menor diferenciación en relación a la morfometría multivariada. A excepción de Claromecó y Necochea, la matriz de clasificación resultante del AFD<sub>PA</sub> (modelo de 6 variables finales altamente significativas) presentó varios casos incorrectamente clasificados a sus localidades de origen (Tabla 6). Además,



**Fig. 4.** Discriminación resultante del contraste entre la 1ª y 2ª funciones canónicas discriminantes (FCD, A) del AFD<sub>IT</sub>, entre la 3ª y 1ª (B), y entre la 3ª y 2ª (C). Las elipses indican el intervalo de confianza del 95% para las localidades de Necochea (línea rayada), Claromecó (línea continua) y Balneario Oriente (línea punteada).

**Tabla 5**

Contribución de las funciones canónicas a la discriminación poblacional. Se muestra el contraste entre los valores medios de las funciones canónicas discriminantes entre las distintas localidades. La primera función discriminante explica el 52% de la discriminación total entre poblaciones. Acrónimos de localidades en **Tabla 1**.

Localidades	Funciones canónicas discriminantes			
	1 <sup>era</sup>	2 <sup>da</sup>	3 <sup>ra</sup>	4 <sup>ta</sup>
CL	-0.690	2.261	-1.065	0.240
BSG	-2.242	-0.600	0.370	-1.750
MH	-1.412	0.031	1.865	0.959
N	4.520	0.063	0.450	-0.361
BO	-0.270	-2.850	-1.272	0.620

**Tabla 6**

Clasificación de casos a las localidades de origen. Se muestra la matriz de clasificación con el porcentaje de casos correctamente clasificados a sus respectivas localidades de origen, a partir del AFD<sub>PA</sub> libre del tamaño del cráneo. Acrónimos de localidades en **Tabla 1**.

Localidades	% de Clasificación	CL	MH	N	BO	BSG
CL	100	19	0	0	0	0
MH	57.14	2 (14.29%)	8 (57.14%)	0	2 (14.29%)	2 (14.29%)
N	100	0	0	14	0	0
BO	92.31	1 (7.69%)	0	0	12 (92.31%)	0
BSG	66.67	1 (8.33%)	2 (16.66%)	0	1 (8.33%)	8 (66.67%)
Total	84.72	23	10	14	15	10

3 de las 4 funciones discriminantes resultaron ser altamente significativas para este modelo.

En resumen, los resultados de ambos AFD muestran que las variables AM, Acr, BA, ABT, AI, GI, LM<sup>3</sup>, AM<sup>3</sup> y LN contribuyen en mayor medida a la discriminación poblacional.

#### AFD a partir de variables angulares (AFD<sub>VA</sub>)

Pese a que varios ejemplares no fueron agrupados a sus respectivas localidades de origen, los resultados del AFD<sub>VA</sub> fueron coincidentes con el AFD<sub>PA</sub>, y en cierta medida con el AFD<sub>IT</sub>. Las localidades de Monte Hermoso y Balneario Sauce Grande fueron agrupadas dentro de la misma población biológica, conformando 4 grupos a partir de las 5 localidades iniciales ( $\lambda$  de Wilks=0.083, F (28.24)=8.37, P < 0.001;

ver matriz de clasificación en **Tabla 7**). Las distancias cuadradas de Mahalanobis tampoco apoyaron la subdivisión poblacional entre Monte Hermoso y Balneario Sauce Grande (**Tabla 8**). Los autovalores de las variables canónicas mostraron que la primera función discriminante logró explicar el 76% de la diferenciación total entre localidades (**Tabla 9**). Los autovalores de las restantes funciones discriminantes aportan en un bajo porcentaje a la discriminación poblacional (17, 4 y 2.9%, respectivamente).

La única variable del modelo discriminante que resultó ser altamente significativa (P < 0.001) en la clasificación de casos fue pm4-in (**Fig. 3A**). Otras variables significativas (P < 0.05) que contribuyeron a la discriminación

**Tabla 7**

Clasificación de casos a las localidades de origen. Se muestra la matriz de clasificación con el porcentaje de casos correctamente clasificados a sus respectivas localidades de origen, a partir del  $AFD_{VA}$ . Además, se muestra el porcentaje de asignación de individuos a las respectivas localidades. Acrónimos de localidades en **Tabla 1**.

Localidades	% de Clasificación	CL	MH	N	BO	BSG
CL	73.7	14 (73.68%)	1 (5.26%)	0	1 (5.26%)	3 (15.79%)
MH	64.3	1 (7.14%)	9 (64.29%)	0	1 (7.14%)	3 (21.43%)
N	93	1 (7.14%)	0	13 (92.86%)	0	0
BO	76.5	3 (17.65%)	0	1 (5.88%)	13 (76.47%)	0
BSG	75	2 (16.66%)	1 (8.33%)	0	0	9 (75%)
Total	76.3	21	14	15	14	12

**Tabla 8**

Diferenciación entre localidades. Matriz de distancias cuadradas de Mahalanobis para el  $AFD_{VA}$  (por arriba de la diagonal) y sus correspondientes valores de probabilidad asociada (por debajo de la diagonal) para las 5 localidades analizadas. Los asteriscos indican diferencias estadísticas significativas (\*  $P < 0.05$ ) y altamente significativas (\*\*  $P < 0.001$ ) entre localidades. NS indica diferencias no significativas. Acrónimos de localidades en **Tabla 1**.

Localidades	CL	MH	N	BO	BSG
CL	-	7.3	8.9	6.6	4.6
MH	**	-	23.4	12.8	1.77
N	**	**	-	4.9	19.5
BO	**	**	**	-	10.9
BSG	**	NS	**	**	-

fueron, en orden de importancia decreciente: m2-in, m2-ex, pm4-ex, m1-in y m1-ex. El primer eje canónico permitió la separación de Necochea del resto de las poblaciones; el segundo contribuyó fundamentalmente a la diferenciación de la localidad de Balneario Oriente (**Figs. 5A y 5B**). Las restantes funciones canónicas discriminantes aportaron muy poco a la diferenciación regional. En la **Tabla 9** se muestra la contribución relativa de cada variable a cada una de las funciones canónicas discriminantes (matriz de estructura). No se in-

cluye la cuarta función canónica discriminante por no ser significativa en la discriminación poblacional.

El  $AFD$  “por pasos hacia atrás” ( $AFD_{VAF}$ ) permitió definir a las variables pm4-in, m2-ex y pm4-ex como las más explicativas en la discriminación de las localidades (variables altamente significativas,  $p < 0.001$ ), coincidiendo en gran medida con los resultados del  $AFD_{VA}$  estándar (**Figs. 5A y 5B**). El  $AFD_{VAF}$  incluyó en último término a la variable m1-ex ( $p < 0.05$ ). Al igual que el  $AFD_{VA}$  estándar, el  $AFD_{VAF}$  discriminó principalmente a la localidad de Necochea del resto de las localidades (en base a la primera función canónica discriminante, la cual explicó el 76% de la variación total entre grupos), e incluyó a las localidades de Balneario Sauce Grande y Monte Hermoso en el mismo grupo poblacional. La correlación canónica sobre esta primera función discriminante fue alta, con un valor de 0.86. La segunda función discriminante sólo explicó el 16% de la variación total entre grupos, siendo la correlación canónica sobre este eje de 0.61. Las otras funciones canónicas discriminantes sólo explicaron el 4.5 y 2.9% de la variación total entre grupos.

#### Variación morfométrica relacionada a la geografía y a la variación molecular a nivel regional

Tanto las distancias cuadradas de Mahalanobis calculadas a partir del  $AFD_{IT}$  como las distancias de Mahalanobis calculadas a partir del



**Tabla 9**

Contribución de las variables angulares en la discriminación poblacional. Se muestra la matriz de estructura del  $AFD_{VA}$  con el peso relativo de cada variable en relación a las 3 primeras funciones canónicas discriminantes. El autovalor (VA) y su correspondiente porcentaje de explicación indican el peso relativo de cada función discriminante a la diferenciación entre localidades. Acrónimos de las variables en Materiales y Métodos.

Variables angulares	Funciones canónicas discriminantes		
	1 <sup>ra</sup>	2 <sup>da</sup>	3 <sup>ra</sup>
Pm4-in	-0.53	-0.40	0.58
M1-in	-0.62	0.05	-0.57
M2-in	-0.37	0.52	-0.07
Pm4-ex	-0.27	-0.70	-0.27
M1-ex	-0.53	-0.16	-0.51
M2-ex	-0.58	0.19	0.24
VA	2.91	0.61	0.17
% de explicación	76	17	4

$AFD_{VA}$  mostraron una correlación significativa con las distancias geográficas entre pares de localidades (test de Mantel,  $r=0.76$ ,  $P < 0.05$ ;  $r=0.72$ ,  $P < 0.05$ , respectivamente). Estos resultados sugieren que la variación morfométrica multivariada a nivel regional se ajustaría a un patrón de aislamiento por distancia.

En concordancia con la variación morfométrica, las distancias genéticas estimadas en base a los datos de variación aloenzimática de Apfelbaum et al. (1991) mostraron una correlación significativa con las distancias geográficas (test de Mantel,  $r=0.75$ ,  $P < 0.05$ ), sugiriendo, al igual que la variación en la morfometría del cráneo, un patrón de aislamiento por distancia a nivel regional.

Ni las distancias cuadradas de Mahalanobis calculadas a partir del  $ACD_{VA}$  ni las calculadas a partir del  $ACD_{IT}$  mostraron una correlación significativa con las distancias genéticas estimadas a partir de aloenzimas (test de Mantel,  $r=-0.024$ ,  $P=0.503$ ;  $r=0.72$ ,  $P=0.164$ ).

Por último, la variación molecular contenida en la Región Control del ADN mitocondrial (estimada a partir del estimador de flujo génico  $M$ , ver Mora et al., 2006) no presentó una correlación significativa ni con las distancias geográficas entre localidades (test de Mantel,

$r=0.16$ ,  $P=0.38$ ), ni con las distancias genéticas estimadas a partir de aloenzimas (test de Mantel,  $r=0.31$ ,  $P=0.28$ ), ni tampoco con las distancias cuadradas de Mahalanobis estimadas a partir del  $ACD_{IT}$  ( $r=0.56$ ,  $P=0.124$ ).

## DISCUSIÓN

Pese a que *C. australis* presenta una distribución limitada a sólo 290 km lineales de dunas costeras, se observó una importante diferenciación morfológica en varios de los caracteres cráneo-dentarios incluidos en los análisis. Los resultados muestran que es posible detectar diferenciación morfológica significativa entre localidades a una escala geográfica de aproximadamente 40 km. Los AFD permitieron discriminar claramente 4 unidades poblacionales a partir de 5 localidades originales, separando principalmente a Necochea del resto de los grupos. Los análisis sugieren cierta similitud entre Monte Hermoso y Balneario Sauce Grande (localidades distantes tan sólo 15 km), pese a observarse diferencias significativas en el  $AFD_{IT}$ .

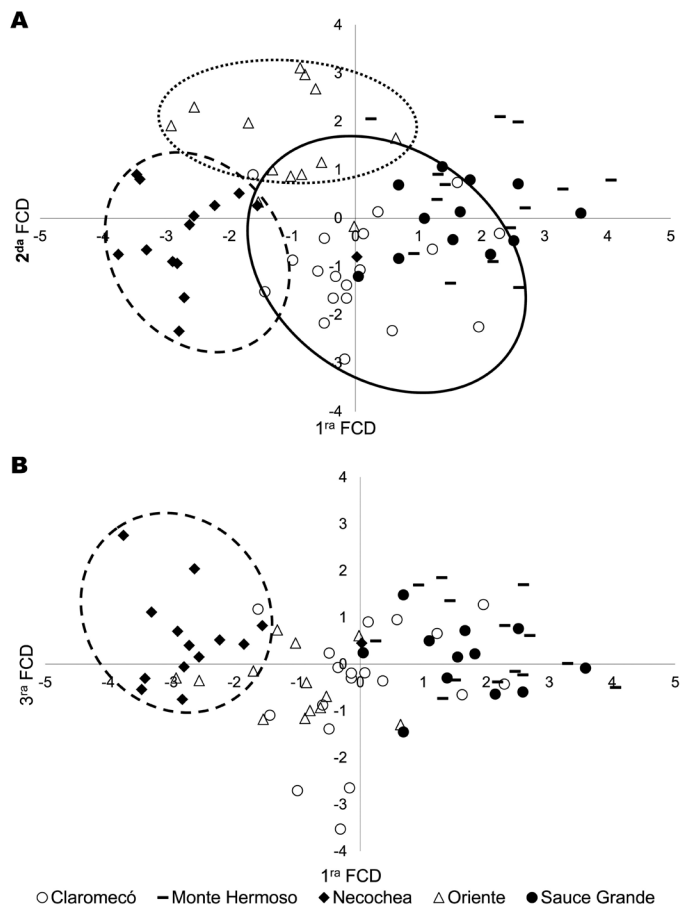
La divergencia en la morfología multivariada del cráneo es, en cierta medida, coincidente con un patrón de aislamiento por distancia, con gran diferenciación entre las localidades

**Fig. 5.** Discriminación resultante del contraste entre la 1ª y 2ª funciones canónicas discriminantes (A) y entre la 1ª y la 3ª (B) del AFD<sub>VA</sub>. Las elipses indican el intervalo de confianza del 95% para las localidades de Necochea (línea rayada), Claromecó (línea continua) y Balneario Oriente (línea punteada).

de los extremos del rango de distribución (Necochea vs. Monte Hermoso y Balneario Sauce Grande). Además, la variación morfológica en variables cráneo-dentarias se encontraría desacoplada, en cierta forma, de la variación molecular reportada para el ADNmt. Mora et al. (2006) sugieren que un proceso de expansión poblacional reciente explicaría la demografía histórica en *C. australis*, proceso que posiblemente estuvo asociado a los ciclos de formación de dunas costeras a partir del Holoceno medio (Isla et al., 1996; Isla, 1998). Así, gran parte de la diferenciación morfológica se habría dado sin una divergencia genética a largo término del ADNmt, apoyando la idea de selección intensa sobre ciertos rasgos poligénicos y divergentes (hipótesis adaptativa). Pese a ello, no se descarta que algunos de estos caracteres presenten, además, un componente de variación ambientalmente inducido (hipótesis no adaptativa).

#### Patrones de variación de los AFD a nivel regional

Tanto el ACD<sub>VA</sub> como el ACD<sub>IT</sub> (utilizando como factor de agrupamiento las localidades de procedencia) fueron concordantes en la discriminación poblacional, formando 4 y 5 grupos, respectivamente, a partir de las 5 localidades de origen. Las dos primeras funciones discriminantes del ACD<sub>IT</sub> y del ACD<sub>VA</sub> explicaron casi la totalidad de la variación existente entre localidades (80 y 93%, respectivamente).



Si bien muchas variables del ACD<sub>IT</sub> involucradas en funciones trófico-excavatorias (véase Mora et al., 2003; Vassallo y Mora, 2007) realizaron un aporte significativo a la diferenciación poblacional (e.g., LM<sup>3</sup>, BA, AM, LC y AI; **Tabla 4**), variables con menor significado en la función dento-excavatoria también contribuyeron, en gran medida, a la diferenciación entre grupos (e.g., PO, AFI, LCG, LN y Acr; **Tabla 4**). En principio, este último patrón sugiere que variables con una implicancia funcional directa en funciones tróficas y/o excavatorias (principalmente producción de fuerzas a nivel del extremo de los incisivos) no son necesariamente las que presentarían mayores restricciones en cuanto a su grado de variación.

Complementariamente, variables incluidas en el ACD<sub>VA</sub>, que en principio tendrían escasa importancia aparente en funciones trófico-

excavatorias, tuvieron gran participación en la diferenciación y formación de los grupos poblacionales mencionados anteriormente (e.g., pm4-in, m1-in, m2-in, m1-ex y m2-ex).

Por otro lado, componentes marcados de variación en el ancho (AFI, PO, ABT y AM), el largo (LCC, BA, LCEI) y en la altura (ACr, AIS) del cráneo estarían reflejando una variación general relacionada a cambios en la forma del cráneo de *C. australis*. Particularmente, las proporciones del último molar, AI, PO y AM tuvieron un mayor aporte en discriminar a la localidad de Necochea del grupo constituido por Balneario Sauce Grande y Monte Hermoso (Tablas 4 y 5).

Además, se observó un aumento del ancho mandibular y una tendencia a la reducción del último molar (tanto en el largo como en el ancho) en dirección Oeste-Este (en dirección Monte Hermoso a Necochea). El patrón de acortamiento en la longitud del tercer molar se ha dado a nivel macroevolutivo al comparar especies de ctenómidos fósiles y vivientes (e.g., *Actenomys* vs. *Ctenomys*, Vassallo y Mora, 2007). Según Verzi (1999), la diferenciación de los ctenómidos podría estar vinculada a los cambios climáticos ocurridos hacia el Mioceno tardío (véase también Vucetich et al., 1999). Los indicadores más elocuentes de la morfología cráneo-dentaria vinculados a dichos cambios son la adquisición de hipsodoncia en los molares (con ciertas modificaciones morfofuncionales asociadas) y las adaptaciones particulares a la fosorialidad (Verzi, 1999, 2002). Verzi (2002) reporta que un acortamiento del cráneo estaría relacionado a una mejora de la ventaja mecánica de los maseteros y estaría en concordancia con una reducción del tercer molar durante la evolución de la euhipsodoncia en Ctenomyidae. Según Vassallo y Mora (2007), el desarrollo de las crestas masetéricas en ctenómidos se correlaciona fuertemente con el desarrollo de los diferentes paquetes de músculos maseteros, llevando a un incremento en la capacidad funcional de generar mayores fuerzas en el extremo de los incisivos. Así, para la mayor parte de las especies de *Ctenomys*, un aumento del ancho mandibular implica una ventaja mecánica directa en la

dento-excavación, o al menos la posibilidad de romper raíces o sustratos de mayor dureza (Vassallo, 1998; Mora et al., 2003). Esto último también es registrado a nivel intraespecífico en poblaciones de especies que ocupan ambientes con diferentes grados de dureza del sustrato (e.g., *C. talarum*; Becerra et al., 2011).

En este trabajo se observa un importante nivel de variación intraespecífica en el ancho mandibular y las proporciones del tercer molar, siendo la localidad de Necochea en donde se registran mayores valores de la primera variable y menores valores de la segunda. A diferencia de otras especies de *Ctenomys* distribuidas en ambientes más heterogéneos (e.g., *C. minutus*; Fornel et al., 2010; *C. talarum*; Vassallo, 1998), *C. australis* presenta gran homogeneidad y especificidad al tipo de hábitat que ocupa dentro de la primera franja de dunas costeras del sureste bonaerense (Contreras y Reig, 1965; Mora et al., 2006). Esto último plantea ciertas limitaciones en cuanto a la interpretación de si posibles diferencias en la ecología trófica y/o excavatoria en esta especie serían responsables de al menos parte de las diferencias geográficas encontradas en este tipo de variables con presunto significado funcional. Fornel et al. (2010) trabajando en poblaciones naturales de *C. minutus* reportan que las variaciones fenotípicas observadas en caracteres cráneo-dentarios con fuerte implicancia biomecánica en la excavación tendrían un origen adaptativo y responderían a diferencias en la dureza del sustrato, en asociación a distinto tipo de ambientes. En principio, la gran homogeneidad del ambiente de dunas costeras no presupone que los procesos de diferenciación poblacional en *C. australis* se encuentren relacionados a heterogeneidad ambiental o un uso diferencial de los recursos. Sin embargo, no se descarta que al menos una parte de dicha variación se encuentre asociada a factores ambientalmente inducidos, los cuales no son evidenciados en este trabajo (e.g., patrones diferenciales de dieta, variación en la dureza del sustrato y/o variables ecológicas del paisaje).

Además, el desarrollo de muchos de estos caracteres, como por ejemplo el ancho de los incisivos y el desarrollo de las crestas maseté-

ricas también presentan gran importancia en la selección sexual (Becerra et al., 2011), pudiendo otorgar una ventaja mecánica en la producción de fuerzas durante encuentros agresivos entre machos durante el apareamiento y defensa de los territorios (Zenuto y Busch, 1998). De todas formas, se esperaría que la variación relacionada al desempeño sexual presentara un comportamiento más homogéneo a nivel geográfico, sin influir sobre las diferencias en el patrón observado.

### **Diferenciación geográfica relacionada a la variación morfométrica y molecular**

En ausencia de efectos selectivos, es esperable que el patrón de variación molecular y morfológico para aquellas especies costeras de *Ctenomys* que presentan distribución restringida a un sistema casi lineal en el espacio y con dispersión limitada (tales como, *C. talarum*, *C. pearsoni*, *C. flamarioni*, *C. minutus*, y en particular *C. australis*) sea mejor explicado por el modelo de aislamiento por distancia (Mora et al., 2006, 2007; Fernández-Stolz et al., 2007; Tomasco y Lessa, 2007; Fornel et al., 2010).

Los resultados de este trabajo muestran que una fracción importante de la variación morfológica en *C. australis* se corresponde, en cierta medida, con un patrón de aislamiento por distancia, siendo Necochea la población con características más divergentes en relación al resto de las poblaciones. Si bien muchas de las variables del  $ACD_{VA}$  se encontrarían más libres de restricciones funcionales (posiblemente de carácter más neutral) al ser comparadas con las variables incluidas en el  $ACD_{IT}$ , los resultados sugieren que los distintos componentes de variación multivariada serían concordantes a nivel regional.

Este último patrón es consistente con los resultados obtenidos en este trabajo a partir del análisis de la variación alozímica en *C. australis* con datos reanalizados de Apfelbaum et al. (1991) para las mismas localidades del presente análisis. Al igual que la información brindada por la variación morfológica, las aloenzimas describen un tipo de variación fenotípica asociado a un fuerte componente

selectivo. Apfelbaum et al. (1991) sugirieron que la diferenciación alozímica entre poblaciones podría deberse a las restricciones que presenta esta especie en cuanto a su hábitat restringido en la primera franja de dunas costeras (ver Mora, 2008). Además, Apfelbaum et al. (1991) describieron altos niveles de homocigotidad en algunas poblaciones y apreciables distancias genéticas entre localidades, lo que indicaría que dichas poblaciones presentarían un alto grado de aislamiento y un número poblacional efectivo reducido. Cabe señalar que los mismos autores reportan la fijación de un tipo de alelo enzimático para la totalidad de las enzimas analizadas en Necochea. En concordancia con los datos de Apfelbaum et al. (1991), este trabajo muestra una gran diferenciación de Necochea en relación al resto de las localidades analizadas.

Además, estudios referidos a la ecología metapoblacional y genética del paisaje realizados a partir de variación genética en loci de microsatélites en *C. australis* (ver Mora et al., 2010) mostraron una importante estructuración genético-poblacional a una escala geográfica de tan sólo 4 km de distancia. Mora et al. (2010) sugieren que la fragmentación natural y pequeñas discontinuidades en el paisaje tendrían gran importancia en explicar dicha estructuración, afectando directamente el movimiento de individuos y el estado de ocupación de los fragmentos de hábitat, y apoyando en último término la idea de un paisaje altamente fragmentado para esta especie. Estos resultados sobre fragmentación y estructuración genético-poblacional ayudarían a explicar el patrón de diferenciación aloenzimática y morfológica a escalas geográficas menores a los 40 km.

Por último, no se observó una correlación entre la diferenciación aloenzimática y la morfológica (tanto las distancias de Mahalanobis estimadas a partir del  $AFD_{IT}$  como a partir del  $ACD_{VA}$ ). Además, el patrón de variación del ADNmt se mostró discordante tanto con los datos de diferenciación aloenzimática como con los datos de diferenciación morfológica. En principio, estos resultados no apoyarían la hipótesis de diferenciación en aislamiento a largo término en el ADNmt (Mora et al., 2006).

### Relación entre los patrones de variación en diferentes marcadores

Discordancias entre patrones de variación molecular y morfológica pueden observarse, en parte, debido a que ciertos marcadores genéticos reflejan de forma más directa la historia o las relaciones genealógicas de las poblaciones que los caracteres morfológicos (Smith y Patton, 1984). Estos últimos, en general, son determinados por múltiples genes y reflejan adaptación local y/o componentes de variación no heredable (e.g., variación ambiental; ver Greenberg et al., 1998). Muchos estudios han reportado diferencias entre patrones de variación a nivel genético y a nivel fenotípico, incluyendo ciertos procesos evolutivos operando a nivel poblacional tales como selección diferencial y grandes fluctuaciones en el tamaño poblacional (e.g., expansiones del rango o cuellos de botella poblacionales), flujo génico y distintas modalidades de interacciones génicas (Strauss, 1989; Hoelzel et al., 2000).

Ciertos factores metodológicos pueden dificultar la interpretación de las relaciones entre la variación genética y morfológica. Algunos sistemas son inherentemente más variables que otros, y la elección del tipo de marcadores genéticos (e.g., loci enzimáticos) pueden afectar en gran medida la estimación de las distancias genéticas (véase Wlasiuk et al., 2003). De esta forma, diferencias en las frecuencias génicas en loci individuales pueden no ser directamente comparables a la variación en rasgos cuantitativos, llevando a grandes diferencias en los resultados de las pruebas estadísticas (Strauss, 1989). No obstante, estos problemas pueden ser resueltos, en cierta medida, al examinar un número amplio de loci génicos y un número suficientemente grande de caracteres morfológicos.

Según Babik et al. (2005), es esperable que una marcada diferenciación morfológica a nivel intraespecífico se encuentre acompañada por un profundo patrón filogeográfico en el ADNmt, al menos en mayor medida que en poblaciones de especies con poca diferenciación morfológica a nivel regional. Sin embargo, esta

última predicción puede no cumplirse en el caso particular en que la variación morfológica haya sido moldeada principalmente por selección.

Mora et al. (2006) sugirieron la posibilidad de un proceso de expansión poblacional reciente para *C. australis* en base a datos de ADN mitocondrial. Esta última hipótesis estaría en discordancia, en parte, con la posibilidad de diferenciación morfológica en aislamiento. Sin embargo, Lande y Barrowclough (1987), Lynch (1988) y Keightley et al. (1993) sugirieron altas tasas de mutación en rasgos poligénicos ( $10^{-3}$ , o aún mayores) en asociación a suficiente variación heredable. Estos autores postularon que la pérdida de variabilidad causada por un cuello de botella y/o posterior expansión poblacional debería ser recobrada más rápidamente para este tipo de caracteres poligénicos que para el ADNmt (efectivamente un locus simple). Esto último podría explicar la presencia de un patrón general de aislamiento por distancia en una fracción importante de la variación morfológica de *C. australis*, coexistiendo posiblemente con un patrón subyacente de variación en rasgos funcionales resultante de una fuerte selección a nivel local. Además, esta última hipótesis no descarta la posibilidad de que parte de la variación fenotípica a nivel geográfico se encuentre ambientalmente inducida (hipótesis no adaptativa; véase ejemplo de "pocket gophers" en Patton y Brylski, 1987; y en aves, en Greenberg et al., 1998).

En síntesis, un rápido equilibrio entre la deriva en rasgos poligénicos del fenotipo y la migración (aislamiento por distancia) no quita la posibilidad de que al menos una parte de la variación morfológica a nivel geográfico pueda ser explicada también por selección diferencial a nivel local (e.g., selección estabilizadora o diversificadora sobre ciertos rasgos del fenotipo; para un enfoque más detallado véase D'Anatro y Lessa, 2011) y/o variación inducida ambientalmente (Greenberg et al., 1998); esto último de forma independiente de la ausencia de estructuración genética a nivel regional en el ADNmt.

Greenberg et al. (1998), trabajando con tres subespecies de aves de marisma, también



describieron un patrón de diferenciación morfológica en rasgos poligénicos en distintos ambientes y asociada a la falta de diferenciación a largo término en el ADNmt. Estos autores sugirieron que si bien parte de la variación morfológica se debería a efectos inducidos por el ambiente, presiones selectivas diferenciales habrían tenido suficiente magnitud como para causar una fuerte y rápida diferenciación morfológica. Dicha diferenciación sería independiente de tasas de flujo génico alto entre demos, y/o a causa de un proceso de expansión reciente en el rango (este último escenario no contaría con el tiempo suficiente para registrar divergencia en el ADNmt).

En relación con esto último, varios trabajos han descripto diferencias morfológicas entre poblaciones naturales de muchas especies de vertebrados (e.g., Patton y Brylski, 1987; Nicola et al., 2003), las cuales han sido realmente pronunciadas a pesar de niveles bajos de diferenciación genética (e.g., DeWolf et al., 1998) y haberse desarrollado en períodos relativamente cortos de tiempo (e.g., Greenberg et al., 1998; Kinnison et al., 1998).

Los resultados de este trabajo sugieren que existe un nivel de variación molecular con características más neutrales en el ADNmt, el cual reflejaría con mayor claridad una señal de expansión demográfica en el rango de distribución de *C. australis*, a pesar de la diferenciación morfológica entre localidades. De esta forma, es posible que la diferenciación morfológica haya ocurrido sin un aislamiento genético a largo término del ADNmt, sugiriendo altas tasas de mutación para caracteres poligénicos, o bien una selección intensa sobre ciertos rasgos de la morfología craneana.

Como fue mencionado anteriormente, gran parte de la variación fenotípica, como lo es la variación relacionada a la morfología del cráneo o la variación aloenzimática, puede estar sujeta a diferentes fuerzas selectivas, o a una combinación de esto último con deriva morfológica neutral (véase Fornel et al., 2010; y D'Anatro y Lessa, 2011), independientemente de una señal de expansión demográfica reciente.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se analizó la existencia de diferenciación morfológica asociada a variación geográfica en el roedor subterráneo *Ctenomys australis*. Conjuntamente se evaluó la congruencia entre los patrones de variación morfológica, alozímica (datos reanalizados de Apfelbaum et al., 1991), y mitocondrial (datos de Mora et al., 2006) a nivel geográfico.

Se plantea que la variación morfológica multivariada habría sido moldeada por dos procesos independientes, el más importante de ellos relacionado al efecto de la deriva morfológica (hipótesis de aislamiento geográfico con bajo nivel de flujo génico poblacional). El segundo, a efectos combinados de selección local (sobre ciertas variables craneanas de mayor implicancia funcional) y variación ambientalmente inducida (esta última difícilmente cuantificable).

Por último, como fue señalado por Mora et al. (2010), pequeñas discontinuidades en el paisaje generan alta fragmentación del ambiente ocupado por esta especie, incidiendo directamente en las tasas de flujo génico entre diferentes demos. La presencia de barreras tales como forestaciones, urbanizaciones, cursos de agua y en especial el avance de los agro-cultivos sobre la línea de médanos costeros impone serias restricciones en cuanto a la dispersión, incrementando el aislamiento poblacional incluso entre poblaciones geográficamente muy cercanas. Desde el punto de vista de la variación morfológica, estas disrupciones en el paisaje podrían incrementar los patrones de diferenciación poblacional, tal cual es registrado actualmente en la localidad de Necochea para aloenzimas, caracteres cráneo-dentarios y variación en loci de microsatélites.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración de Damián Romero (encargado de la colección de mamíferos del MMP) quien nos permitió el acceso al material cráneo-dentario de *Ctenomys* para este estudio. Además agradecemos las correcciones realizadas por Guillermo D'Elia en las etapas tempranas del manuscrito. Este trabajo fue financiado con subsidios de AGENCIA (PICT 2008-1452 y PICT 2010-1551) y de la Universidad Nacional de Mar del Plata (15/E454).

## LITERATURA CITADA

- APFELBAUM LI, AI MASSARINI, LE DALEFFE y OA REIG. 1991. Genetic variability in the subterranean rodents *Ctenomys australis* and *Ctenomys porteousi* (Rodentia: Octodontidae). *Biochemical Systematics and Ecology* 19:467-476.
- BABIK W, W BRANICKI, J CRNOBRNJAK-ISAIOVI, D COGĂLNICEANU, I SAS, K OLGUN, NA POYARKOV, M GARCIA-PARÍS y JW ARNTZEN. 2005. Phylogeography of two European newt species: discordance between mtDNA and morphology. *Molecular Ecology* 14:2475-2491.
- BECERRA F, A ECHEVERRÍA, AI VASSALLO y A CASINOS. 2011. Bite force and jaw biomechanics in the subterranean rodent Talas tuco-tuco (*Ctenomys talarum*) (Caviomorpha: Octodontidae). *Canadian Journal of Zoology* 89:334-342.
- BOOKSTEIN FL, B CHERNOFF, RL ELDER, JM HUMPHRIES, GR SMITH y RE STRAUSS. 1985. Morphometrics in evolutionary biology. Special Publication 15, pp. 277. Philadelphia: The Academy of Natural Sciences.
- CASINOS A, C QUINTANA y C VILADIU. 1992. Allometry and adaptation in the long bones of a digging group of rodents (Ctenomyiinae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 107:107-115.
- CASTILLO HA, MN CORTINAS y EP LESSA. 2005. Rapid diversification of South American tuco-tucos (*Ctenomys*; Rodentia, Ctenomyidae): contrasting mitochondrial and nuclear intron sequences. *Journal of Mammalogy* 86:170-179.
- CHATFIELD C y AJ COLLINS. 1980. Introduction of multivariate analysis. Chapman and Hall, London.
- CONTRERAS JR y OA REIG. 1965. Datos sobre la distribución del género *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae) en la zona costera de la Provincia de Buenos Aires comprendida entre Necochea y Bahía Blanca. *Physis* 25:169-186.
- CROW JF y M KIMURA. 1970. An introduction to population genetics theory. Minneapolis MN: Burgess.
- D'ANATRO A y EP LESSA. 2006. Geometric morphometric analysis of geographic variation in the Río Negro tuco-tuco, *Ctenomys rionegrensis* (Rodentia: Ctenomyidae). *Zeitschrift für Säugetierkunde* 71:288-298.
- D'ANATRO A y EP LESSA. 2011. Phenotypic and genetic variation in the white croaker *Micropogonias furnieri* Desmarest 1823 (Perciformes: Sciaenidae): testing the relative roles of genetic drift and natural selection on population divergence. *Journal of Zoology* 285:139-149.
- D'ELÍA G, EP LESSA y JA COOK. 1998. Geographic structure, gene flow, and maintenance of melanism in *Ctenomys rionegrensis* (Rodentia: Octodontidae). *Zeitschrift für Säugetierkunde* 63:285-296.
- DE WOLF H, T BACKELJAU y R VERHAGEN. 1998. Congruence between allozyme and RAPD data in assessing macrogeographical genetic variation in the periwinkle *Littorina striata* (Mollusca, Gastropoda). *Heredity* 81:486-492.
- DOS REIS SF, LM PÊSSOA y RE STRAUSS. 1990. Application of size-free canonical discriminant analysis to studies of geographic differentiation. *Revista Brasileira de Genética* 13:509-520.
- DUBOST G. 1968. Les mammifères souterrains. *Revue J'Ecologie et Biologie du Sol* 5:99-133.
- ELLERMAN JR. 1940. The families and genera of living rodents. Volume 1: Rodents other than Muridae. British Museum (Natural History), London.
- FERNÁNDEZ-STOLZ GP, JFB STOLZ y RT FREITAS. 2007. Bottlenecks and dispersal in the tuco-tuco das dunas *Ctenomys flamarioni* (Rodentia: Ctenomyidae), in southern Brazil. *Journal of Mammalogy* 88:935-945.
- FORNEL R, P CORDEIRO-ESTRELA y RT DE FREITAS. 2010. Skull shape and size variation in *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae) in geographical, chromosomal polymorphism, and environmental contexts. *Biological Journal of the Linnean Society* 101:705-720.
- FREITAS RT. 2005. Analysis of skull morphology in 15 species of the genus *Ctenomys*, including seven karyologically distinct forms of *Ctenomys minutus* (Rodentia: Ctenomyidae). Pp. 131-154, *en*: Mammalian diversification from chromosomes to phylogeography: a celebration of the career of James L. Patton, Vol. 133 (EA Lacey y P Myers, eds). Berkeley, CA: University of California Publications in Zoology.
- GREENBERG R, PJ CORDERO, S DROEGE y RC FLEISCHER. 1998. Morphological adaptation with no mitochondrial DNA differentiation in the coastal plain swamp sparrow. *The Auk* 115:706-712.
- HOELZEL AR, C CAMPAGNA y T ARNBOM. 2000. Genetic and morphometric differentiation between island and mainland southern elephant seal population. *Proceedings of the Royal Society of London B* 268:325-332.
- ISLA FI. 1998. Holocene coastal evolution of Buenos Aires. *Quaternary of South America & Antarctic Peninsula* 11:297-321.
- ISLA IF, LC CORTIZO y EJ SCHNACK. 1996. Pleistocene and Holocene beaches and estuaries along the Southern Barrier of Buenos Aires. *Quaternary Science Reviews* 15:833-841.
- KEIGHTLEY PD, TEC MACKAY y A CABALLERO. 1993. Accounting for bias in estimates of the rate of polygenic mutation. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 253:291-296.
- KIMURA M. 1953. "Stepping Stone" model of population. *Annual Report National Institute of Genetics, Japan* 3:62-63.
- KIMURA M y GH WEISS. 1964. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* 49:561-576.
- KINNISON M, M UNWIN, N BOUSTEAD y TP QUINN. 1998. Population-specific variation in body dimensions of adult chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) from New Zealand and their source population, 90 years after introduction. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55:554-563.

- LANDE R. 1991. Isolation by Distance in a Quantitative Trait. *Genetics* 128:443-452.
- LANDE R y GF BARROWCLOUGH. 1987. Effective population size, genetic variation and their use in population management. Pp. 87-123, *en*: *Viable Populations for Conservation* (M Soulé, ed.). Cambridge University Press, New York.
- LEHMANN WH. 1963. The forelimb architecture of some fossorial rodents. *Journal of Morphology* 113:56-76.
- LESSA EP. 1990. Morphological evolution of subterranean mammals: integrating structural, functional, and ecological perspective. Pp. 211-230, *en*: *Evolution of Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular Levels* (E Nevo y OA Reig, eds.). New York: Wiley-Liss.
- LESSA EP. 2000. The evolution of subterranean rodents: a synthesis. Pp. 389-420, *en*: *Life underground: the biology of subterranean rodents* (EA Lacey, JL Patton y G Cameron, eds.). University of Chicago Press, Chicago and London.
- LESSA EP y J PATTON. 1989. Structural constraints, recurrent shapes, and allometry in pocket gophers (genus *Thomomys*). *Biological Journal of the Linnean Society* 36:349-363.
- LESSA EP y CS THAELE. 1989. A reassessment of morphological specializations for digging in pocket gophers. *Journal of Mammalogy* 70:689-700.
- LESSA EP y B STEIN. 1992. Morphological constraints in the digging apparatus of pocket gophers (Mammalia: Geomyidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 47:439-453.
- LESSA EP, AI VASSALLO, DH VERZI y MS MORA. 2008. Evolution of morphological adaptations for digging in living and extinct ctenomyid and octodontid rodents (Rodentia: Caviomorpha: Octodontoidea). *Biological Journal of the Linnean Society* 95:267-283.
- LYNCH M. 1988. The rate of polygenic mutation. *Genetic Research* 51:137-148.
- MANTEL N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27:209-220.
- MAYNARD-SMITH J y JG SAVAGE. 1959. The mechanics of mammalian jaws. *School Science Review* 40:289-301.
- MORA MS. 2008. Biología metapoblacional del tuco-tuco de las dunas (*Ctenomys australis*): efectos de la estructura espacial del hábitat sobre la ecología y genética poblacional. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.
- MORA MS, AI OLIVARES y AI VASSALLO. 2003. Size, shape and structural versatility of the subterranean rodent *Ctenomys* (Rodentia, Caviomorpha): Functional and morphological analysis. *Biological Journal of the Linnean Society* 78:85-96.
- MORA MS, EP LESSA, MJ KITTLEIN y AI VASSALLO. 2006. Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys australis* in sand-dune habitats: Evidence of population expansion. *Journal of Mammalogy* 87:1192-1203.
- MORA MS, EP LESSA, AP CUTRERA, MJ KITTLEIN y AI VASSALLO. 2007. Phylogeographical structure in the subterranean tuco-tuco *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae): contrasting the demographic consequences of regional and habitat-specific histories. *Molecular Ecology* 16:3453-3456.
- MORA MS, FJ MAPELLI, OE GAGGIOTTI, MJ KITTLEIN y EP LESSA. 2010. Dispersal and population structure at differential spatial scales in the subterranean rodent *Ctenomys australis*. *BMC Genetics Online* 11:1-14.
- MORRISON DF. 1976. *Multivariate Statistical Methods*. McGraw Hill, New York.
- MORTON NE. 1973. Isolation by distance. Pp. 76-79, *en*: *Genetic Structure of Populations* (NE Morton, ed.). Honolulu: University Press of Hawaii.
- NEI M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 106:283-292.
- NEVO E. 1979. Adaptive convergence and divergence of subterranean mammals. *Annual Review of Ecology and Systematic* 10:269-308.
- NEVO E y OA REIG. 1990. *Evolution of subterranean mammals at the organismal and molecular levels*. New York: Wiley-Liss.
- NICOLA PA, LA MONTEIRO, LM PESSOA, ACR ALVES, FJ VON ZUBEN, FJ ROHLF y SF DOS REIS. 2003. Congruence of hierarchical, localized variation in cranial shape and molecular phylogenetic structure in *Trinomys yonenagae* (Rodentia: Echimyidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 80:385-396.
- PARADA A, G D'ELÍA, CJ BIDAÚ y EP LESSA. 2011. Species groups and the evolutionary diversification of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy* 92:671-682.
- PATTON JL y PV BRYLSKI. 1987. Pocket gophers in alfalfa fields. Causes and consequences of habitat-related body size variation. *American Naturalist* 130:493-506.
- POGSON GH, CT TAGGART, KA MESA y RG BOUTILIER. 2001. Isolation by distance in the Atlantic cod, *Gadus morhua*, at large and small geographic scales. *Evolution* 55:131-146.
- REIG OA, C BUSCH, MO ORTELLS, JR CONTRERAS. 1990. An overview of evolution, systematics, population biology, cytogenetics, molecular biology and speciation in *Ctenomys*. Pp. 71-96, *en*: *Evolution of Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular Levels* (E Nevo y OA Reig, eds.). New York: Allan Liss.
- SLATKIN, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236:787-792.
- SLATKIN, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47:264-279.
- SMITH MF y JL PATTON. 1984. Dynamics of morphological differentiation: temporal impact of gene flow in pocket gophers populations. *Evolution* 38:1079-1087.
- STRAUSS ER. 1985. Evolutionary allometry and variation in body form in the South American catfish genus *Corydoras* (Callichthyidae). *Systematic Zoology* 34:381-396.

- STRAUSS ER. 1989. Associations between genetic heterozygosity and morphological variability in freshwater sculpins, genus *Cottus* (Teleostei: Cottidae). *Biochemical Systematics and Ecology* 17:333-340.
- TURGEON J y L BERNATCHEZ. 2001. Clinal variation at microsatellite loci reveals historical secondary intergradation between glacial races of *Coregonus artedii* (Teleostei: Coregoninae). *Evolution* 55:2274-2286.
- VASSALLO AI. 1998. Functional morphology, comparative behaviour, and adaptation in two sympatric subterranean rodents of genus *Ctenomys* (Caviomorpha: Octodontidae). *Journal of Zoology* 244:415-427.
- VASSALLO AI. 2000. Alometría e isometría en varias especies de roedores caviomorfos, con comentarios sobre la estructura del aparato masticatorio del Orden Rodentia. *Mastozoología Neotropical* 7:37-46.
- VASSALLO AI y MS MORA. 2007. Interspecific scaling and ontogenetic ontogenetic growth patterns of the skull in living and fossil octodontid rodents (Caviomorpha: Octodontidae). Pp. 945-968, en: *The quintessential naturalist: honoring the life and legacy of Oliver P. Pearson* (DA Kelt, E Lessa, JA Salazar-Bravo y JL Patton, eds.). University of California Publications in Zoology.
- VERZI DH. 1999. The dental evidence on the differentiation of the ctenomyine rodents (Caviomorpha, Octodontidae; Ctenomyinae). *Acta Theriologica* 44:263-282.
- VERZI DH. 2002. Patrones de evolución morfológica en Ctenomyinae (Rodentia: Octodontidae). *Mastozoología Neotropical* 9:309-328.
- VUCETICH MG, DH VERZI y JL HARTENBERGER. 1999. Review and analysis of the radiation of the South American Hystricognathi (Mammalia: Rodentia). *Journal of Vertebrate Palaeontology* 329:763-769.
- WEIR BS y CC COCKERHAM. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- WLASIUK G, JC GARZA y EP LESSA. 2003. Genetic and geographic differentiation in the Río Negro tuco-tuco (*Ctenomys rionegrensis*): Inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. *Evolution* 57:913-926.
- WRIGHT S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28:114-138.
- WRIGHT S. 1978. *Evolution and the genetics of populations. Volume 4. Variability within and among natural populations*. University of Chicago Press, Chicago.
- ZENUTO RR y C BUSCH. 1998. Population biology of the subterranean rodent *Ctenomys australis* (Tuco-tuco) in a coastal dunefield in Argentina. *Zeitschrift für Säugetierkunde* 63:357-367.

## APÉNDICE

Material cráneo-dentario de *C. australis* por localidad utilizado en los análisis y perteneciente a las colecciones del Museo Municipal de Ciencias Naturales y Tradicional "Lorenzo Scaglia" (MMPMa, I, FN, P, M) y Laboratorio de Ecofisiología, Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP). Entre paréntesis se indica sexo (M=macho, H=hembra) y peso corporal en gramos (g), cuando estos datos están disponibles.

Claromecó: I 1046 (H, 290g), I 1045 (H, 355g), I 1037 (H, 390g), I 1036 (H, 335g), I 1052 (H, 270g), I 1039 (H, 325g), I 1055 (H, 265g), I 1041 (H, 330g), I 1042 (H, 250g), I 1038 (H, 315g), I 1035 (H, 240g), I 1040 (H), I 1049 (H, 235g), I 1081 (M, 465g), MMPMa 3236 (M, 625g), I 1051 (M, 325g), I 1053 (M, 480g), I 1050 (M, 360g), I 1043 (M, 250g).

Monte Hermoso: I 1063 (H, 200g), I 1062 (H, 260g), I 1074 (H, 280g), I 1059 (H, 260g), I 1060 (H, 270g), I 1071 (H, 320g), I 1067 (H, 300g), I 1065 (H, 330g), I 1070 (H, 256g), I 1064 (H, 235g), I 1057 (H, 215g), I 1048 (M, 550g), I 1073 (M, 340g), I 1056 (M, 270g).

Necochea: 2 UNMdP (H, 243g), Ca 18 (2) UNMdP (H, 213g), 82-239 UNMdP (H, 410g), MMPMa 2817 (H, 300g), 82-240 UNMdP (H, 433g), MMPMa 2486/I 736 (H), MMPMa 2489/I 739 (H), MMPMa 2816/86-73 (M), FN 82-238 UNMdP (M, 425g), M 81-1 (M), Ca 20 (3) UNMdP (H), P 87-32 (M, 200g), Ca 17 UNMdP (M), P 87-46 (H, 155g).

Balneario Oriente: I 1092 (H, 365g), I 1084 (H, 360), I 1085 (H, 410g), I 1093 (H, 250g), I 1082 (H, 345g), I 1086 (H, 346g), I 1096 (H, 360g), I 1095 (H, 305g), I 1088 (H, 295g), I 1089 (H, 265g), I 1083 (H, 265g), I 1091 (H, 320g), I 1090 (H, 230g).

Balneario Sauce Grande: MMPMa 1778/85-32 (H, 370g), MMPMa 1786/85-40 (H, 280g), MMPMa 1798/85-53 (H, 270g), FN 85-41 (H), MMPMa 1785/85-39 (H), MMPMa 1787/85-42 (H), MMPMa 1795/85-50 (H), MMPMa 2537/85-30 (H), FN 85-5 (M, 220g), MMPMa 1805/85-64 (M), MMPMa 1806/85-65 (M), MMPMa 2536/85-29 (M).